

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/FR05/000729

International filing date: 25 March 2005 (25.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: FR
Number: 0403178
Filing date: 26 March 2004 (26.03.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 13 June 2005 (13.06.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse



BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 11 AVR. 2005

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIETE
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint-Petersbourg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23
www.inpi.fr





26 bis, rue de Saint Pétersbourg - 75800 Paris Cedex 08

Pour vous informer : INPI DIRECT

INPI direct 0 825 83 85 87

0,15 € TTC/min

Télécom 133 000 016 85

REMIS DANS LES

DATE

LIEU

INPI PARIS 34 SP

Réserve à l'INPI

0403178

N° D'ENREGISTREMENT

NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE

PAR L'INPI

26 MARS 2004

Vos références pour ce dossier

(facultatif) 36070/FR

Confirmation d'un dépôt par télécopie N° attribué par l'INPI à la télécopie**2 NATURE DE LA DEMANDE** Cochez l'une des 4 cases suivantes

Demande de brevet



Demande de certificat d'utilité



Demande divisionnaire



Demande de brevet initiale



ou demande de certificat d'utilité initiale



Transformation d'une demande de brevet européen Demande de brevet initiale

BREESE-MAJEROWICZ
3 avenue de l'Opéra
75001 PARIS**BREVET D'INVENTION
CERTIFICAT D'UTILITÉ**

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE
page 1/2

N° 11354*04

BR1

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 @ W / 030103

26 MARS 2004

Réserve à l'INPI

0,15 € TTC/min

DATE

LIEU

INPI PARIS 34 SP

0403178

N° D'ENREGISTREMENT

NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE

PAR L'INPI

26 MARS 2004

Vos références pour ce dossier

(facultatif) 36070/FR

Confirmation d'un dépôt par télécopie N° attribué par l'INPI à la télécopie**2 NATURE DE LA DEMANDE** Cochez l'une des 4 cases suivantes

Demande de brevet



Demande de certificat d'utilité



Demande divisionnaire



Demande de brevet initiale



ou demande de certificat d'utilité initiale



Transformation d'une demande de brevet européen Demande de brevet initiale

Date Date Date **3 TITRE DE L'INVENTION** (200 caractères ou espaces maximum)

Procédé pour amplifier l'activité de vaccins thérapeutiques

**4 DECLARATION DE PRIORITE
OU REQUESTE DU BENEFICE DE
LA DATE DE DEPOT D'UNE
DEMANDE ANTERIEURE FRANCAISE**

Pays ou organisation

Date

N°

Pays ou organisation

Date

N°

Pays ou organisation

Date

N°

 S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»**5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)** Personne morale Personne physiqueNom
ou dénomination sociale

ANDRIEU

Prénoms

Jean-Marie

Forme juridique

N° SIREN

Code APE-NAF

Domicile
ou
siège

Rue

95 Boulevard Saint-Michel

Code postal et ville

17 500 51 PARIS

Pays

France

Nationalité

France

N° de téléphone (facultatif)

N° de télécopie (facultatif)

Adresse électronique (facultatif)

 S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»Remplir impérativement la 2^{me} page


**BREVET D'INVENTION
CERTIFICAT D'UTILITÉ**
**REQUÊTE EN DÉLIVRANCE
page 2/2**
BR2
26 MARS 2004

REMISE DES PIÈGES

Réserve à l'INPI

DATE

/5 INPI PARIS 34 SP

LIEU

0403178

N° D'ENREGISTREMENT

NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

DB 540 W / 191203

6 MANDATAIRE (s'il y a lieu)		
Nom		BREESE
Prénom		Pierre
Cabinet ou Société		BREESE-MAJEROWICZ
Nationalité		France
N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel		
Adresse	Rue	3 avenue de l'Opéra
	Code postal et ville	75100 Paris
	Pays	France
N° de téléphone (facultatif)		01 47 03 67 77
N° de télécopie (facultatif)		01 47 03 67 78
Adresse électronique (facultatif)		office@breese.fr
7 INVENTEUR (S)		
Les inventeurs sont nécessairement des personnes physiques		
<input checked="" type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)		
8 RAPPORT DE RECHERCHE		
Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)		
<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>		
Choix à faire obligatoirement au dépôt (cf. Notice explicative Rubrique 8)		
9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES		
Uniquement pour les personnes physiques		
<input type="checkbox"/> Requise pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Obtenue antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence) : AG <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>		
10 SÉQUENCES DE NUCLEOTIDES ET/OU D'ACIDES AMINÉS		
<input type="checkbox"/> Cochez la case si la description contient une liste de séquences		
<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>		
Le support électronique de données est joint La déclaration de conformité de la liste de séquences sur support papier avec le support électronique de données est jointe		
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes		
II SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI
BREESE Pierre		
921038		



BREVET D'INVENTION
CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

CEDEX
N° 11354*04

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

Page suite N° 1.../1...



26 MARS 2004

Préserve à l'INPI

REMBISE DES PIÈCES
DATE

5 INPI PARIS 34 SP

LIEU

0403178

N° D'ENREGISTREMENT

NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 829 @ W /210103

Vos références pour ce dossier (facultatif)		36070/FR
4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		Pays ou organisation Date <input type="text"/> N° Pays ou organisation Date <input type="text"/> N° Pays ou organisation Date <input type="text"/> N°
5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)		<input type="checkbox"/> Personne morale <input checked="" type="checkbox"/> Personne physique
Nom ou dénomination sociale		LU
Prénoms		Louis
Forme juridique		
N° SIREN		<input type="text"/>
Code APE-NAF		<input type="text"/>
Domicile ou siège	Rue	35 Quai de Grenelle
	Code postal et ville	7510115 PARIS
	Pays	France
Nationalité		France
N° de téléphone (facultatif)		
N° de télécopie (facultatif)		
Adresse électronique (facultatif)		
6 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)		<input type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique
Nom ou dénomination sociale		
Prénoms		
Forme juridique		
N° SIREN		<input type="text"/>
Code APE-NAF		<input type="text"/>
Domicile ou siège	Rue	
	Code postal et ville	<input type="text"/>
	Pays	
Nationalité		
N° de téléphone (facultatif)		
N° de télécopie (facultatif)		
Adresse électronique (facultatif)		
7 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		BRÉESE Pierre 921038
		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI

Procédé pour amplifier l'activité de vaccins thérapeutiques

L'invention se place dans le domaine de l'immunologie, plus spécifiquement dans celui de l'immunothérapie active spécifique aussi appelé vaccin thérapeutique.

5 Elle couvre l'utilisation d'un ou plusieurs composés déplétant les lymphocytes B du système immunitaire. Ces composés sont destinés à être administrés à un patient au moment d'une vaccination, particulièrement une vaccination thérapeutique, contre une tumeur et/ou une infection chronique virale, parasitaire ou à germe intracellulaire dans le but d'amplifier et/ou de prolonger l'activité cytotoxique des lymphocytes T à l'égard des
10 cellules tumorales ou des cellules infectées par un virus, un parasite ou un germe intracellulaires.

Le système immunitaire est chargé de détruire (élimination) ou d'empêcher la prolifération (maintenir dans l'organisme à très basse concentration) les microbes, virus et parasites qui y ont pénétré. Le système immunitaire est principalement formé des
15 organes lymphoïdes secondaires, du thymus, de la moelle osseuse et d'un réseau de cellules placées près des revêtements cutanés et muqueux. Les organes lymphoïdes secondaires principaux sont les ganglions externes situés au niveau du cou, des aisselles, des aines et les ganglions internes situés au niveau du thorax et de l'abdomen. Les plaques de Peyer situés le long du tube digestif sont aussi des formations très importantes
20 du système immunitaire de même que la rate.

Le système immunitaire est formé de plusieurs types de cellules qui ont chacune des spécificités particulières. Les cellules dendritiques issues des monocytes du sang, sont chargées d'ingérer de minimes fractions des pathogène (virus, bactéries, parasites), en général dans la région où ils ont pénétré l'organisme, puis de les couper en morceau
25 pour les présenter à leur surface sous forme de peptides (fragments de protéines) appelés antigènes. Dans le même temps, les cellules dendritiques migrent vers les différentes composantes du système immunitaire.

Les cellules immunitaires les plus nombreuses sont appelées les lymphocytes ; elles circulent dans le sang, mais la majorité des lymphocytes se trouvent dans la moelle
30 et les organes lymphoïdes. Au sein de ces organes, ils sont capables de reconnaître les antigènes présentés à la surface des cellules dendritiques.

Il existe plusieurs types de lymphocytes :

- Les lymphocytes B se multiplient et se différencient au contact d'une cellule

dendritique présentant l'antigène. Ces lymphocytes B se différencient au cours de leur multiplication. Ils prennent alors le nom de plasmocytes et siègent principalement dans la moelle ; ils produisent des anticorps spécifiques des peptides antigéniques qui ont été présentés aux lymphocytes B par les cellules dendritiques (ou d'autres types cellulaires capables de présenter des antigènes). Les anticorps sont des protéines qui circulent dans les vaisseaux et les espaces extracellulaires ; ils sont capables de se fixer sur l'antigène en cause et de préparer ainsi la destruction des cellules porteuses de cet antigène. Ces anticorps sont aussi capables de neutraliser l'activité biologique de micro-organismes qui circuleraient dans le sang ou les milieux extracellulaires et de préparer leur destruction.

10 - Les lymphocytes T CD8 sont principalement les lymphocytes cytotoxiques. Après multiplication puis maturation, au sein du système immunitaire et particulièrement au sein des organes lymphoïdes, au contact de la cellule dendritique porteuse d'antigène, ces lymphocytes T CD8 acquièrent la capacité de détruire toutes les cellules portant l'antigène avec lesquelles elles rentrent en contact.

15 - Une troisième catégorie de lymphocytes, les lymphocytes T CD4, est absolument indispensable à la prolifération et à la maturation des lymphocytes B (qui vont produire des anticorps) et des lymphocytes T CD8 (qui vont produire des cellules cytotoxiques). Ces lymphocytes T CD4 sont aussi spécifiques de chaque type d'antigène ; après être entrés au contact de la cellule dendritique au sein des organes lymphoïdes, ils ont la capacité particulière de favoriser la multiplication et la maturation des lymphocytes CD8 (il s'agit alors particulièrement de lymphocytes T CD4, helpers de type 1 (TH1)) ou de favoriser la multiplication et la maturation de lymphocytes B spécifiques de tel ou tel antigène (il s'agit alors de lymphocytes T CD4 TH2).

25 Le système immunitaire est ainsi particulièrement efficace pour contrôler ou au mieux pour éliminer de l'organisme des cellules infectées par différents types de micro-organismes tels que virus, microbe, parasites. Certains types de pathogènes nécessitent majoritairement ou exclusivement la mise en marche de lymphocytes B à l'origine de la production d'anticorps ; on dit qu'ils mettent en jeu l'immunité humorale. A l'inverse, 30 certains virus, parasites ou microbes situés à l'intérieur des cellules, nécessitent préférentiellement la mise en marche de lymphocytes TCD8 capables de détruire ces cellules infectées. Ces lymphocytes CD8 sont responsables de ce que l'on nomme l'immunité cellulaire.

Une vaccination thérapeutique consiste en l'administration d'antigènes spécifiques de tumeurs ou de microbes, virus ou parasites. Ces antigènes spécifiques peuvent être administrés au patient sous forme de cellules infectées ou tumorales, préalablement inactivées (par un moyen physique ou chimique). Ils peuvent aussi être 5 administrés sous forme de protéines ou de peptides, mais aussi d'ADN ou d'ARN spécifiques des protéines ou des peptides en cause. Ces ADN ou ces ARN peuvent être eux-mêmes libres ou introduits au sein de vecteurs ADN ou ARN viraux ou non viraux. Quels que soient le type et la forme de la préparation administrée, le plus souvent par 10 voies sous-cutanées (les voies intramusculaire et intraveineuse pouvant aussi être utiles, de même que la voie *per os*), l'objectif final est que cette préparation soit finalement transformée en peptides présentés à la surface des cellules dendritiques (ou d'autres types 15 de cellules capables de présenter l'antigène).

Le succès d'une vaccination, quelle que soit la forme de la préparation antigénique, nécessite le plus souvent, l'utilisation concomitante d'adjuvants d'origine 15 minérale, chimique ou de composés biologique d'origine naturelle.

La préparation antigénique (cellule tumorale ou infectée inactivée, protéines, peptide, ADN, ARN) peut aussi être administré *in vitro*, à des cellules dendritiques préparées *ex vivo* à partir de cellules sanguines grâce à des cytokines. Ces cellules dendritiques sont modifiées par l'action des cytokines pour exprimer à leur surface des 20 antigènes (peptides) spécifiques. Une fois qu'elles ont été mises en contact de façon appropriée avec la préparation antigénique, ces cellules dendritiques chargées *ex vivo* en antigènes, sont administrées au patient, le plus souvent par injection sous-cutanée. Ces cellules migrent vers les organes lymphoïdes et provoquent la prolifération et la 25 différenciation des lymphocytes T8 cytotoxiques à l'égard de cellules tumorales ou infectées (qui sont porteuses des antigènes en cause) et/ou à l'égard des lymphocytes B qui, se transformant en plasmocytes producteurs d'anticorps dirigés contre les peptides antigéniques portés par les cellules tumorales ou les cellules infectées, peuvent permettre de faciliter la lyse de ces cellules.

On peut attendre du principe de vaccination thérapeutique qu'il favorise le 30 contrôle ou même l'éradication d'infections chroniques ou de tumeurs. Il demeure que les résultats cliniques de ces vaccins thérapeutiques contre différents types de cancers ou contre des infections chroniques sont très médiocres.

On comprend de ce qui précède, l'importance aussi bien des lymphocytes T

cytotoxiques que celles des lymphocytes B dans la réaction immunitaire et particulièrement dans la réussite potentielle de vaccins thérapeutiques. Selon les connaissances actuelles, la présence et l'activité des lymphocytes B apparaissent comme essentielles pour obtenir une réaction immunitaire satisfaisante.

5 Or, de manière surprenante et inattendue, les inventeurs ont maintenant constaté qu'un composé déplétant ou inhibant les lymphocytes B naïfs des organes lymphoïdes, est capable d'amplifier la réaction immunitaire de type cellulaire.

En effet, les inventeurs ont observé que l'administration d'un composé déplétant les lymphocytes B naïfs, permettait d'augmenter la réponse cellulaire T spécifique à un 10 vaccin thérapeutique formé d'un virus de l'immunodéficience du singe (VIS) inactivé par méthode chimique et d'un adjuvant (adjuvant incomplet de Freud) et administré par voie sous-cutanée à des singes infectés par le virus de l'immunodéficience du singe.

15 Ce résultat surprenant va à l'encontre des connaissances généralement admises concernant la réaction immunitaire telles qu'elles ont été brièvement exposées précédemment. Il apparaît en effet que la déplétion des lymphocytes B lorsqu'elle est associée à une vaccination visant à stimuler l'immunité cellulaire, non seulement ne semble pas délétère, mais semble favoriser l'efficacité de la réaction de l'immunité 20 cellulaire.

Ainsi les inventeurs proposent à titre de premier objet de l'invention, l'utilisation 25 d'un composé déplétant ou inhibant les lymphocytes B, particulièrement les lymphocytes B naïfs, dans la préparation d'une composition destinée à être administrée à un patient dans le but d'amplifier une réaction immunitaire des lymphocytes T cytotoxiques.

Avantageusement selon l'invention, ladite composition peut être administrée à un patient dans le but d'amplifier une réaction immunitaire des lymphocytes T cytotoxiques 30 lorsque celle-ci est suscitée par une vaccination, préférentiellement une vaccination thérapeutique, contre une tumeur et/ou contre une infection chronique virale, parasitaire ou à germe intracellulaire.

Selon l'invention, le composé déplétant ou inactivant les lymphocytes B peut être tout composé dont l'administration entraîne une déplétion des lymphocytes B ou à tout le moins une inactivation des lymphocytes B, c'est-à-dire un composé dont l'administration à pour conséquence une diminution, voire un arrêt complet transitoire de l'activité des lymphocytes B.

Ledit composé peut être par exemple un anticorps, monoclonal ou polyclonal,

particulièrement un anticorps dirigé contre les lymphocytes B. Particulièrement ledit composé peut être un anticorps dirigé contre l'antigène transmembranaire CD20 des lymphocytes pré-B ou B matures. Préférentiellement, l'anticorps est un anticorps monoclonal dirigé contre l'antigène transmembranaire CD20 des lymphocytes pré-B ou B matures.

Ledit anticorps peut être un anticorps naturel, ou obtenu par génie génétique. L'anticorps peut être d'origine humaine, ou de tout autre mammifère comme par exemple murin ou encore produit par génie génétique, comme par exemple dans des microorganismes, ou encore par synthèse chimique.

L'anticorps peut être ou ne pas être humanisé. Il peut être un anticorps chimère ou recombiné. Particulièrement, l'anticorps peut être l'anticorps monoclonal vendu sous la dénomination RITUXIMAB®. Il s'agit alors d'un anticorps chimérique murin/humain obtenu par génie génétique ; il s'agit d'une immunoglobuline glycosylée associant d'une part les régions constantes d'une IgG1 humaine et d'autre part les régions variables des chaînes légères et lourdes d'origine murine. Cet anticorps est produit par une culture de cellules de mammifères (ovaires de hamster chinois) et purifié par chromatographie d'affinité et d'échange d'ions, comportant des procédés d'inactivation et d'élimination virales spécifiques.

Cet anticorps, particulièrement son fragment Fab, se lie spécifiquement à l'antigène transmembranaire CD20 des lymphocytes B. Cet antigène ne s'internalise pas lors de la liaison à l'anticorps et il n'est pas libéré de la surface cellulaire. Le CD20 ne circule pas sous forme libre dans le plasma et n'entre donc pas en compétition pour la liaison à l'anticorps.

Une fois lié à l'antigène CD20 des lymphocytes B, le complexe formé entre l'anticorps, ou le fragment Fab de celui-ci, et l'antigène CD20, génère des fonctions d'effecteur immunitaire qui entraînent la lyse de ces lymphocytes par l'intermédiaire du fragment Fc. Les mécanismes possibles de la lyse cellulaire sont une cytotoxicité dépendante du complément (CDC), faisant intervenir la liaison du fragment C1q, et une cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC), passant par un ou plusieurs des récepteurs Fc gamma de la surface des granulocytes, des macrophages et des cellules NK.

Ainsi, selon l'invention, le composé déplétant ou inactivant les lymphocytes B peut être un fragment Fab d'un anticorps dirigé contre l'antigène transmembranaire CD20

des lymphocytes pré-B ou B matures.

Selon l'invention, la composition dans la préparation de laquelle le composé déplétant ou inhibant les lymphocytes B est utilisé, peut être administrée par tout moyen connu, antérieurement, concomitamment ou postérieurement à une vaccination, 5 particulièrement une vaccination thérapeutique contre une tumeur et/ou contre une infection chronique virale, parasitaire ou à germe intracellulaire., L'administration de la composition selon l'invention peut être réalisée par tout moyen adéquat connu. On citera par exemple l'injection, particulièrement l'injection sous-cutanée ou intraveineuse ou intramusculaire, ou encore l'administration par voie orale. Préférentiellement, 10 l'administration est réalisée par une injection intraveineuse.

La composition de l'invention, peut comprendre tout support connu, biologiquement compatible pour une administration à un patient. On peut citer à titre d'exemple, l'eau déminéralisée stérile, le sérum physiologique ou encore une solution pour perfusion.

15 Selon l'invention, une utilisation particulièrement préférée est l'utilisation d'un composé déplétant ou inhibant les lymphocytes B, dans la préparation d'une composition destinée à être administrée à un patient dans le but d'augmenter la réponse cellulaire T spécifique à un vaccin thérapeutique, comprenant au moins un virus de l'immunodéficience humaine (VIH) inactivé. Particulièrement, le composé déplétant est 20 un anticorps, avantageusement monoclonal, dirigé contre l'antigène transmembranaire CD20 des lymphocytes pré-B ou B matures.

La Figure 1 représente le résultat obtenu par une vaccination thérapeutique pratiquée sur des singes infectés par un virus de l'immunodéficience du singe (VIS) et 25 traités ou non selon l'invention avec un anticorps monoclonal dirigé contre l'antigène transmembranaire CD20 des lymphocytes B (RITUXIMAB®). Les courbes représentent le nombre de copies d'ARN du virus VIS par millilitre de plasma des singes infectés par le VIS puis ayant reçu un an après l'infection un vaccin thérapeutique composé de virus VIS inactivés et d'adjuvant, et traités ou non au RITUXIMAB®, en fonction du nombre 30 de jours après la vaccination thérapeutique.

Dans cette Figure sont représentés les résultats obtenus avec :

- : un vaccin VIS inactivé + adjuvant ;
- : un vaccin VIS inactivé + adjuvant précédé (J-3) et suivi (j + 4 et j + 11) d'une

administration de RITUXIMAB®.

D'autres caractéristiques de l'invention apparaîtront dans l'exemple de réalisation de l'invention, ainsi que dans la Figure, sans pour autant que ceux-ci ne constituent une
5 quelconque limitation de l'invention.

EXEMPLE : Mesure de l'effet d'un composé déplétant les lymphocytes B sur la réponse des cellules T après vaccination thérapeutique contre un virus

□ Matériels et Méthodes :

- 10 • Le projet de recherche a été approuvé par le comité des études animales de l'Institut de Médecine Tropicale de Guangzhou, Chine.
- Préparation du virus inactivé : le virus VISmac251 a été inactivé par traitement à l'aldrithiol-2 (AT-2) comme décrit précédemment (Lu, W. et coll., J. Virol., 75 : 8949-8956, 2001). Le virus VIS-AT-2 inactivé a été concentré par ultracentrifugation pour obtenir une concentration finale de 2.10^{10} particules virales /ml, et a ensuite été congelé à -80°C pour conservation jusqu'à son utilisation.
- 15 • Animaux : 8 macaques adultes sains, rhésus "colony-bred" proviennent du Shunde Experimental Animal Center (Guangdong, China). Les animaux ont été infectés avec le virus VISmac251, comme décrit précédemment (Lu, W. et coll., Nat. Med. 9 : 27-32, 2003), une année avant la vaccination thérapeutique.
- Préparation du vaccin thérapeutique : Le virus VIS-AT-2 inactivé a été décongelé à température ambiante. 10^{10} particules virales (0,5ml) ont alors été mélangées à 0,5 ml d'adjuvant incomplet de Freund (Sigma-Aldrich Chimie Sarl, Saint Quentin Fallavier, France) pour donner 1 ml de vaccin VIS-AT-2 inactivé. Ce mélange a été utilisée pour immuniser les animaux.
- 20 • Vaccination : Les 8 animaux ont reçu 1 injection sous-cutanée de 0,25 ml à la racine des 4 membres (soit au total 1 ml) de vaccin VIS-AT-2 inactivé . 4 d'entre eux ont reçu du RITUXIMAB® par voie intraveineuse, à raison de 10 mg/kg, 3 jours avant la vaccination thérapeutique, puis 4 jours et 11 jours après ladite vaccination thérapeutique.
- 25 • Mesures virologiques et immunologiques : La mesure de la charge virale et de la cytolysé virospécifique ont été réalisées régulièrement toutes les 2 semaines, comme décrit précédemment (Lu, W. et coll., J. Virol., 75 : 8949-8956, 2001 ; Lu,

W. et coll., Nat. Med. : 1081-1085, 1999) sans modification. La réponse des cellules CD4⁺ Th1 et des cellules-T mémoires CD8⁺ a été mesurée par le test en spot de la sécrétion de l'interféron-γ à l'aide du kit ELISPOT de R&D Systems Europe (Lille, France) selon les recommandations du fournisseur.

- 5 • Analyses statistiques : Les tests de Mann-Whitney ou de Wilcoxon ont été utilisés pour comparer les données avant et après immunisation.

□ Résultats :

Mesure de l'effet du composé déplétant les lymphocytes B :

10 4 semaines après la vaccination thérapeutique, la quantité d'ARN du virus de l'immunodéficience du singe (VIS) contenue dans le plasma des singes a diminué de 100 fois chez les animaux vaccinés et traités au RITUXIMAB® et de 10 fois chez les animaux vaccinés mais non traités au RITUXIMAB®. La Figure 1 présente ces résultats.

15 □ Conclusion

Il apparaît que la déplétion temporaire, ou l'inhibition des lymphocytes B naïfs est un outil puissant dans la promotion de la réponse cytotoxique antigène spécifique des cellules T au cours de l'immunisation contre des virus ou des tumeurs.

REVENDICATIONS

5 1) Utilisation d'un composé déplétant ou inhibant les lymphocytes B, dans la préparation d'une composition destinée à être administrée à un patient dans le but d'amplifier une réaction immunitaire des lymphocytes T cytotoxiques.

10 2) Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que les lymphocytes B sont des lymphocytes B naïfs.

10 3) Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce que la réaction immunitaire des lymphocytes T cytotoxiques est suscitée par une vaccination.

15 4) Utilisation selon la revendication 3, caractérisée en ce que la vaccination est une vaccination contre une tumeur et/ou contre une infection chronique virale, parasitaire ou à germe intracellulaire.

15 5) Utilisation selon l'une quelconque des revendications 3 ou 4, caractérisée en ce que la vaccination est une vaccination thérapeutique.

15 6) Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que le composé déplétant ou inactivant les lymphocytes B est un anticorps polyclonal ou monoclonal, ou un fragment Fab d'un anticorps.

20 7) Utilisation selon la revendication 6, caractérisée en ce que l'anticorps ou le fragment Fab de l'anticorps, est dirigé contre l'antigène transmembranaire CD20 des lymphocytes pré-B ou B matures.

20 8) Utilisation selon l'une quelconque des revendications 6 ou 7, caractérisée en ce que l'anticorps est un anticorps monoclonal.

25 9) Utilisation selon l'une quelconque des revendications 6 à 8, caractérisée en ce que l'anticorps est un anticorps chimérique murin/humain obtenu par génie génétique.

30 10) Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisée en ce que la composition est destinée à être administrée antérieurement et/ou concomitamment et/ou postérieurement à une vaccination, particulièrement une vaccination contre une tumeur et/ou contre une infection chronique virale, parasitaire ou à germe intracellulaire

30 11) Utilisation selon la revendication 10, caractérisée en ce que la vaccination est une vaccination thérapeutique.

Revendications

5 1) Utilisation d'un anticorps, à titre de composé déplétant ou inhibant les lymphocytes B, dans la préparation d'une composition destinée à être administrée à un patient dans le but d'amplifier une réaction immunitaire des lymphocytes T cytotoxiques.

10 2) Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que les lymphocytes B sont des lymphocytes B naïfs.

15 3) Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce que la réaction immunitaire des lymphocytes T cytotoxiques est suscitée par une vaccination.

20 4) Utilisation selon la revendication 3, caractérisée en ce que la vaccination est une vaccination contre une tumeur et/ou contre une infection chronique virale, parasitaire ou à germe intracellulaire.

25 5) Utilisation selon l'une quelconque des revendications 3 ou 4, caractérisée en ce que la vaccination est une vaccination thérapeutique.

30 6) Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que l' anticorps est un anticorps polyclonal ou monoclonal, ou un fragment Fab d'un anticorps.

20 7) Utilisation selon la revendication 6, caractérisée en ce que l'anticorps ou le fragment Fab de l'anticorps, est dirigé contre l'antigène transmembranaire CD20 des lymphocytes pré-B ou B matures.

25 8) Utilisation selon l'une quelconque des revendications 6 ou 7, caractérisée en ce que l'anticorps est un anticorps monoclonal.

30 9) Utilisation selon l'une quelconque des revendications 6 à 8, caractérisée en ce que l'anticorps est un anticorps chimérique murin/humain obtenu par génie génétique.

30 10) Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisée en ce que la composition est destinée à être administrée antérieurement et/ou concomitamment et/ou postérieurement à une vaccination, particulièrement une vaccination contre une tumeur et / ou contre une infection chronique virale, parasitaire ou à germe intracellulaire

11) Utilisation selon la revendication 10, caractérisée en ce que la vaccination est une vaccination thérapeutique.

5

12) Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, caractérisée en ce que la composition est destinée à être administrée à un patient dans le but d'augmenter la réponse cellulaire T spécifique à un vaccin thérapeutique comprenant un virus de l'immunodéficience humaine (VIH) inactivé.

13) Utilisation selon la revendication 12, caractérisée en ce que le composé déplétant est un anticorps, avantageusement monoclonal, dirigé contre l'antigène transmembranaire CD20 des lymphocytes pré-B ou B matures.

12) Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, caractérisée en ce que la composition est destinée à être administrée à un patient dans le but d'augmenter la réponse cellulaire T spécifique à un vaccin thérapeutique comprenant un virus de l'immunodéficience humaine (VIH) inactivé.

5 13) Utilisation selon la revendication 12, caractérisée en ce que le composé déplétant est un anticorps, avantageusement monoclonal, dirigé contre l'antigène transmembranaire CD20 des lymphocytes pré-B ou B matures.

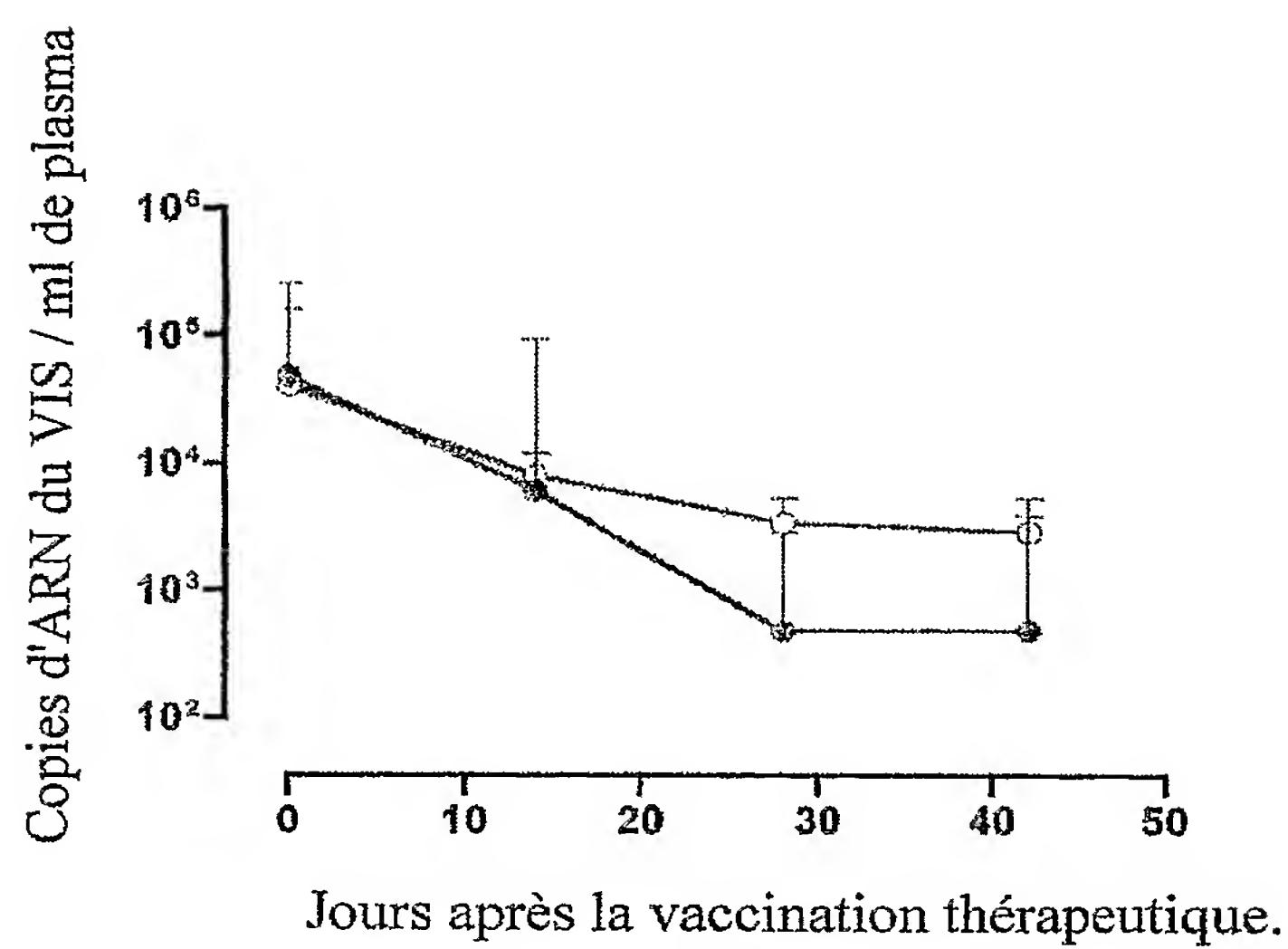


FIGURE 1



